

1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013707874

WPI Acc No: 2001-192098/200120

XRAM Acc No: C01-057766

**Nutritious composition contains symbiotic fermentation culture medium of dead probiotics**

Patent Assignee: WU B (WUBB-I); SANZHU PHARM CO LTD (SANZ-N)

Inventor: DONG L; SUN Y; WU B; SUN X; WANG H

Number of Countries: 095 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
CN 1273838	A	20001122	CN 2000111082	A	20000426	200120 B
WO 200185186	A1	20011115	WO 2001CN617	A	20010426	200175
AU 200163735	A	20011120	AU 200163735	A	20010426	200219

Priority Applications (No Type Date): CN 2000111082 A 20000426

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

CN 1273838	A		A61K-035/78	
------------	---	--	-------------	--

WO 200185186	A1 C		A61K-035/66	
--------------	------	--	-------------	--

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA  
CH CO CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP  
KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT  
RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR  
IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW

AU 200163735	A		A61K-035/66	Based on patent WO 200185186
--------------	---	--	-------------	------------------------------

Abstract (Basic): CN 1273838 A

NOVELTY - A nutritious composition contains deactivated or dead probiotics and its metabolism resultant for recovering and maintaining the health and relative physiological functions of the gastrointestinal tract. The process for preparing it features that in same culture medium and under same fermenting condition, a classified inoculation and symbiotic fermentation method is used to culture and reproduce more probiotics. The mixed probiotic culture resultant can be used to prepare the nutritive composition for recovering and maintaining the balance of normal microbial pools in the gastrointestinal tract, improving specific or non-specific immunity and resisting against tumor.

DwgNo 0/0

Title Terms: NUTRIENT; COMPOSITION; CONTAIN; SYMBIOTIC; FERMENTATION;  
CULTURE; MEDIUM; DEAD

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-035/66; A61K-035/78

International Patent Class (Additional): C12P-001/04

File Segment: CPI

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日:  
2001年11月15日(15.11.01)

PCT

(10) 国际公布号:  
WO 01/85186 A1

(51) 国际分类号<sup>7</sup>: A61K 35/66, 35/78, C12P 1/04

(21) 国际申请号: PCT/CN01/00617

(22) 国际申请日: 2001年4月26日(26.04.01)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
00111082.9 2000年4月26日(26.04.00) CN

(71)(72) 发明人/申请人: 吴炳新(WU, Bingxin) [CN/CN];  
中国山东省济南市山大北路 77 号, Shandong 250100 (CN).

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 董立山(DONG, Lishan) [\*/CN]; 孙筱林(SUN, Xiaolin) [\*/CN]; 王红(WANG, Hong) [CN/CN]; 中国山东省济南市山大北路 77 号, Shandong 250100 (CN).

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街2号8层, Beijing 100037 (CN).

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))对所有指定国
- 关于申请人在国际申请日有权要求该在先申请的优先权(细则 4.17(iii))对所有指定国
- 发明人资格(细则 4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT 公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: PREPARATION THAT CONTAINS THE INTESTINAL BENEFICIAL BACTERIUM FERMENTATION CULTURE

(54) 发明名称: 含有肠道益生菌发酵培养物的制品

(57) Abstract: The present application relates to beneficial microorganisms preparation that contains various kinds of probiotics that benefit to the intestine and the producing method. The application further discloses producing said preparation by fractional inoculation and culturing the probiotics under the same fermentation condition. The said preparation can not only be used to regulate the micro-ecological balance in enteron but also to improve the mouse's immunological functioning by stimulating the specific or non-specific immunological response. The preparation can be used to improve the function of the gastrointestinal tract.

(57) 摘要

本发明涉及一种含有肠道益生菌的微生物制剂及其生产方法。本发明进一步涉及在同一培养基和同样的发酵条件下, 以分级接种、共生发酵法培养所述肠道益生菌的方法, 所述含有肠道益生菌的培养物可用于维持肠道内的正常菌群平衡, 也可以通过刺激特异性或非特异行免疫反应以改善小鼠的免疫功能。本发明的制剂可用于改善胃肠道健康。



WO 01/85186 A1

日起一个月内，申请人可以向本单位提出意见。

### 发明所属领域

本发明总地涉及用于恢复和维持胃肠道健康及相关生理功能的，含有灭活的或死亡的益生菌及其代谢产物的营养组合物、其生产方法及其在改善肠道菌群平衡和刺激特异性或非特异性免疫功能中的应用。本发明特别涉及在同一培养基中和同样发酵条件下，以分级接种、共生发酵方法培养和增殖多种益生菌的方法，以及所说的益生菌混合培养物在制备用于恢复和维持胃肠道正常菌群平衡、改善机体特异性或非特异性免疫功能及抗肿瘤活性的营养组合物中应用。

### 发明背景

一切干扰宿主的因素，不论是物理的、化学的，还是生物都会引起微生态的平衡失调。对于健康的人体，常常可能因为手术（特别是腹部手术）、外伤、精神压力、肿瘤、胆盐刺激及滥用抗生素等机体内环境或外环境的变化导致肠道内微生物菌群紊乱，即有益和有害肠道微生态间的平衡失调。其中，导致肠道正常微生物菌群失调的最重要的因素是长期滥用抗生素。一旦正常菌群的发酵过程受到破坏，即可导致许多有益细菌的减少，进而使结肠粘膜衰竭。同时，因潜在的恶性细菌的迅速生长而严重损害结肠粘膜功能。有害细菌穿透功能失常的结肠壁并感染器官，引起器官的脓肿或使多数器官功能减弱甚至丧失。以前，人们常常使用各种抗生素预防或治疗肠道菌群失调，特别是腹部手术后肠道正常菌群失调所致的继发感染。然而，长时间大量使用抗生素不仅花费很高，而且难于纠正正常肠道菌群失调，特别是往往因致病菌的过度生长而导致病情进一步恶化。

为了调整正常肠道微生态平衡，一种普遍接受的方法是筛选并利用人们已知的、在正常胃肠道内占优势并可在小肠粘膜上定植的非致病无毒性细菌，添加或不添加膳食纤维、寡聚糖或免疫球蛋白、含硫氨基酸等辅助成份，制成药物组合物或营养补充剂，投用于需要进行正常肠道微生态失调治疗的病人。大量的实验室研究和临床观察证明，微生态平衡疗法可对于改善和维持胃肠道菌群平衡、改善机体特异性或非特异性免疫及降低血胆固醇发挥不可替代的作用。

已有许多现有技术文献描述了益生菌的治疗作用及其应用。例如，Fernandes详细评述了以食品或发酵乳制品方式引入体内的乳杆菌，特别是嗜酸性乳杆菌的益生作用（Fernandes et al., “Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products”, FEMS Microbiology Reviews 46:343-356, 1987）。Nobuo Saegara的研究证明，口服粪链球菌可显著地改善人和动物的脂质代谢（Microecology and therapy, vol. 15, 271-280, 1985）。欧洲专利EP 0199535描述了从粪便中分离的，体外试验证明能够在肠粘膜上粘附的酸性乳杆菌的纯培养物。国际专利WO 89/05849描述了从猪胃肠道中分离的，可在猪胃肠道上皮细胞上粘附，并对强酸和胆汁有耐受性的乳酸菌。可使用所说的细菌制造发酵乳品，并用以预防或治疗小猪的大肠杆菌性腹泻。另一方面，美国专利4, 805, 368公开了一种以膳食纤维为基础的含有嗜酸性乳杆菌和/或两歧双歧杆菌、乳脂明串珠菌（*Leuconostoc citrovorum*）及谢氏丙酸杆菌（*Propionibacterium shermanii*）的益生菌组合物及其制备方法。美国专利4, 913, 913描述了混合或分别培养奶酪乳杆菌（*L. casei*）和长双歧杆菌（*B. longum*），以制备含双歧杆菌的乳酸菌发酵乳品的方法。美国专利5, 716, 615公开了包括嗜热链球菌、乳杆菌和双歧杆菌的，用于治疗胃肠道疾病和高胆固醇血症的药物组合物。美国专利5, 744, 134

还描述了含有免疫球蛋白和可溶性膳食纤维、多价铁螯合分子和葡萄糖酸，以及一种或多种肠道益生菌的，用于促进胃肠道健康的组合物。最后，本发明人于1993年提交并已授权的中国专利93101172.0公开了一种含有热杀死的嗜酸性乳酸菌（*Lactobacillus acidophilus*）、短双歧杆菌（*Bifidobacterium breve*）和屎肠球菌（*Enterococcus faecium*）的营养补充剂（即所谓“三株口服液”）。与其他现有技术不同，虽然该悬液态营养补充剂不含活的益生菌，但据信所说的悬液中含有多种有益的细菌酶及其他细菌代谢产物，并且由于其生产过程中使用了富含可溶性纤维和大豆异黄酮的培养基成分，所以不仅有利用细菌的存活和生长，而且也为所说的营养混合物提供了这些及其他有益成分。

然而，无论是生产含活的还是死的多种益生菌的组合物，并且无论只含一种或多种细菌还是另外含有其他辅助成分的组合物，上述现有技术均没有描述在同一培养基中和同一发酵条件下，以分级培养和共生发酵技术培养并增殖两种以上肠道益生菌的方法。

### 发明概要

因此，本发明的一个目的是提供一种含有灭活的或热杀死的一种或多种益生菌，并含有可溶性膳食纤维及大豆异黄酮的悬液态营养组合物。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的益生菌选自双歧杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、肠球菌属、丙酸菌属、明串珠菌属及芽孢杆菌属的一种或多种人肠道非致病菌。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的益生菌选自两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、嗜酸性乳杆菌、保加利亚乳杆菌、奶酪乳杆菌、德氏乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、嗜柠檬酸明串珠菌、枯草杆菌和地衣形孢杆菌。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的可溶性纤维含量约为每毫升含20-40  $\mu\text{g}$ ，并且其中所说的大豆异黄酮含量为每毫升30-100  $\mu\text{g}$ 。

本发明的另一个目的是提供生产上文限定的悬液态营养组合物的方法，该方法包括：

(1) 提供基本上由大豆芽蒸煮液、蛋白酶解牛肉肉汤、酵母浸膏、糖和矿物质组成的液体培养基；

(2) 按照湿菌体生物量约占培养基总重量0.5-1.0%的比例，依次向培养基内接种一种或多种细菌，并在每接入一种细菌后，于38-41℃的温度和pH6.6条件下，厌氧培养4-10小时；

(3) 当发酵培养物中菌体总浓度约达到 $7 \times 10^8/\text{ml}$ 以上时，使温度降至约32℃并维持2-4小时，以完成生物代谢转化；

(4) 当发酵培养物的pH降至大约3.5-3.9时，使温度升高至48-50℃并保持4-6小时，以完成菌体热灭活和发酵体系稳定化。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的液体培养基是由约25%大豆芽煎煮液、约2.5%胰蛋白酶水解牛肉肉汤、约1.3%酵母浸膏、约1.3%葡萄糖、约1.3%蔗糖和适当量包括 $\text{Mg}^{++}$ 、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 的矿物质组成的。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的大豆芽蒸煮液是发芽大豆在水中按30% (W/V) 比例混合并于105-121℃下蒸煮30分钟，然后经常规过滤得到的滤液。

本发明的再一个目的是提供上述营养组合物在纠正和维持肠道正常微生物生态平衡中的应用。

本发明的再一个目的是提供上述营养组合物在调整机体非特异性免疫反应中的应用。

本发明的再一个目的是提供上述营养组合物在生物转化或修饰一种或多种天然药物的有效成分并使之发挥或改善其生物学活性中的应用。

### 发明的附图说明

附图1显示单独发酵培养短双歧杆菌、屎肠球菌和嗜酸性乳杆菌时，三种细菌各自的生物量随时间变化的增殖曲线。

附图2显示在同一培养基中和同样培养条件下，短双歧杆菌、屎肠球菌和嗜酸性乳杆菌混合共生培养时，总生物量随时间变化的增殖曲线。

### 发明的详细说明

本发明涉及一种含有热杀死的肠道益生菌，并含有由微生物培养基提供的可溶性纤维及大豆异黄酮的营养组合物。本发明进一步涉及以分级接种和共生发酵技术，在同一培养基及同样条件下培养二种或二种以上益生菌的方法。所说的营养组合物经口服投用后，可有效地恢复和维持胃肠道正常菌群平衡、改善特异性或非特异性免疫功能并降低血胆固醇水平。

目前商品化的益生菌制剂，大多宣称使用的是一株或多株可耐受胃内强酸性（1.0）和小肠上部1-1.5%胆盐环境的，并可在小肠粘膜表面定居的益生菌。然而，这些制剂的研制人员却相对轻视了益生菌的大量代谢产物的益生作用。事实上，目前微生物生态学领域普遍接受这样一个观点：为维持机体的微生态平衡，除肠道正常细菌群体外，还存在一类所谓的“益生物质”，包括微生物表面活性物质及其一系列代谢产物，例如维生素、抗体、肽、肽聚糖及氨基酸等。这些物质可有效地抑制胃肠道内及可发酵食物中某些有毒细菌的生长。已有许多实验证明了某些死亡的细菌和其碎片如细胞壁、肠内物质及细菌代谢产物对人和动物的有益作用。例如有人证明，被杀死的乳酸菌能够粘附到肠粘膜上皮细胞上，通过竞争性排斥在空间上抑制致病菌与肠道细胞毛刷状缘结合部位的接触，从而阻止致病菌在肠道内定植，切断细菌感染的第一个关键性步骤。Coconnier

等人的研究显示,热杀死的嗜酸性乳杆菌和保加利亚乳杆菌对Caco-2细胞(一种用于研究人肠道细胞的组织和功能的,具有典型的肠道细胞分化特征的细胞系)和粘膜分泌性HT29-MTX细胞具有高度粘附性,从而可通过阻断人肠道细胞的病原受体来阻止肠道致病菌对CaCO-2及HT29-MTX细胞的粘附和侵袭(Coconnier MH, J. Diarrhoeal Des. Res. 11(4):235-242, 1993; Coconnier, FEMS Microbiol. lett. 110(3):299-305, 1993)。另外,Quwehand和Conway(J. Appl. Bacteriol. 80(3):311-318, 1996)发现,乳杆菌104r细胞株死亡后释放一种能够抑制肠毒素型大肠杆菌K88在小肠粘膜上粘附的物质,而且证明这种可在溶菌酶作用下失活并含有葡萄糖和半乳糖的物质,只有在培养过程中不断由死菌释放到细菌培养物中时才表现有这样的抑制活性。

也已就死的益生菌的肿瘤抑制活性进行了许多研究。已知肠道细菌如大肠杆菌和粪肠球菌能产生多种使前致癌物转化为致癌物的酶,如 $\beta$ -葡糖醛酸酶和硝基还原酶等。另外,益生菌代谢产生的乳酸和短链脂肪酸(SCFA)可导致肠道内pH值降低,使这些代谢酶的活性受到抑制,从而阻止肠道内致癌物质的形成。再者,乳酸菌等益生菌对致突变物质的特殊结合能力,也发挥一定的抗突变和肿瘤生成抑制作用。张学斌(J. Dairy Sci. 73(3):1477-1481, 1991)的研究发现,某些乳酸菌如乳脂链球菌和嗜酸性乳杆菌,以及两歧双歧杆菌的菌体成分(包括胞浆和菌体细胞壁骨架成分)对诱变剂TRP-P-1和N-亚硝基二甲胺具有很强的结合能力。Sekine等人(Cancer Res., 45:1300-1310, 1985)证明,婴儿双歧杆菌细胞壁中分离的肽聚糖(WPG)作为一种生物反应调节剂,对肿瘤生长具有明显地抑制作用。并且进一步的研究显示,益生菌菌壁制剂(WPG)的抗肿瘤活性是由于WPG诱导细胞因子表达并激活巨噬细胞产生大量一氧化氮所导致的。

最后,就死益生菌的免疫调节作用而言,已有人发现热杀死的



乳酸菌KVS20能够激活静止和活动期的巨噬细胞(Kitazawa, H. et al., J. Dairy Sci., 74:2082-2088, 1991)。另外, 还有人发现, 热杀死的嗜热链球菌可刺激巨噬细胞和T辅助细胞产生细胞因子, 使TNF- $\alpha$ 水平增加约135-176倍, IL-6水平增加约31-192倍(Marin ML, J. Food Prot. 61C7):859-864, 1998)。

从上述以前的研究结果可以看出, 益生菌死菌制剂无论是在理论上还是在实践上都已证明是有效的。另外, 这里还应提到的一个不容忽视的问题是, 现已发现包括屎肠球菌在内的许多传统的益生菌均可能携带抗生素抗性质粒, 而这些质粒可能在适当条件下在外来的或肠道内固有的益生菌或致病菌之间转移。一旦这样的抗生素抗性质粒转入肠道致病菌内, 便有可能造成严重的不良后果, 从而给使用活益生菌制剂的病人留下潜在隐患, 这也是本发明人确定使用灭活的益生菌制剂作为本发明营养组合物的理由之一。

为了制备作为营养组合物或补充剂的含有死的益生菌共生发酵培养物的益生菌制剂, 可以选用本领域已知的任何两种或两种以上的人正常肠道益生菌。所说的益生菌包括但不只限于选自双歧杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、肠球菌属、丙酸菌属、明串珠菌属及芽孢杆菌属的一种或多种人肠道非致病菌, 特别是包括但不只限于两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、嗜酸性乳杆菌、保加利亚乳杆菌、奶酪乳杆菌、德氏乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、嗜柠檬酸明串珠菌、枯草孢杆菌和地衣形芽孢杆菌。

用于发酵培养本发明中使用的益生菌的培养基基本上是由大豆芽蒸煮液、蛋白酶解牛肉肉汤、酵母浸膏、糖及矿物质组成的。本发明中使用的培养基不同于常规细菌发酵培养基, 其主要特征在于其中除含有基本碳源(葡萄糖和蔗糖)、氮源(酶解肉汤和酵母浸膏)及矿物质外, 还特别加入了占液体培养基较大重量比(约25%)的大豆芽蒸煮液。用于本发明的典型的培养基组成如下:

2.5% 酶解牛肉肉汤、1.3% 酵母浸膏、25%大豆芽煎煮液、1.3% 葡萄糖、1.3%蔗糖、0.05%  $\text{MgSO}_4$ 、0.05%  $\text{CaCO}_3$ 、0.03%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.03%  $\text{NaCl}$ 。以上比例均为重量百分比 (W/W)。

这里应特别指出的是，培养基中的大豆芽蒸煮液主要并不是作为氮源和/或碳源加入的。培养基中加入大豆芽蒸煮液的目的主要在于为益生菌培养液提供或补充大豆异黄酮、可溶性纤维及大豆寡糖（如水苏糖和棉籽糖）。已知大豆异黄酮类化合物（包括大豆甾元、染料木黄酮及大豆黄素）作为植物雌激素，具有抗自由基、降低血脂、减小心血管疾病的危险性、防止绝经期女子内分泌失调引起的骨质疏松等作用。大豆芽浸出液中所含有的可溶性食物纤维可阻止肠道内中性脂肪及胆固醇的吸收、促进胃肠蠕动、防止便秘并延缓或抑制碳水化合物的吸收。另外，大豆芽浸出液中所含有的大豆寡糖可被肠道乳酸菌分解利用，但几乎不被肠道有害菌利用，从而有利于纠正肠道菌群失调。总之，以大豆芽蒸煮液作为益生菌培养基成分和本发明营养组合物的主要成分之一，代表了本发明技术特征的一个重要方面。经检测，按本发明方法制得的益生菌液体培养物中所含大豆异黄酮和可溶性纤维的浓度分别为20-40  $\mu\text{g/ml}$ 和30-100  $\mu\text{g/ml}$ 。

为了制备作为培养基主要组分的大豆芽蒸煮液，首先将新鲜的成熟大豆在约2倍体积的温水中浸泡5-6小时，以使大豆组织吸水膨胀。然后置于25-27℃环境下保温60-72小时，以使大豆生长出长约3-8厘米的胚芽。收集发芽并吸水膨胀的大豆，按照每升斤发芽大豆加约3升水的比例向发芽大豆中加入自来水，并在控制温度约105-121℃的高压蒸煮容器内加热30分钟。加热后，通过双层滤布过滤并收集如此得到的发芽大豆蒸煮液。

用于本发明的培养基中的另一个主要组分是蛋白酶处理的新鲜牛肉和牛肝组织水解物。与现有技术中所使用的常规肉汤不同的是：本发明的肉汤在由材选择上不仅使用牛肉组织，还加用了富含各种

酶类的牛肝脏组织，另外肉汤制备中还使用了从猪或牛胰腺中提取的粗制胰蛋白酶制剂。因此，为了制备作为本发明所用培养成分的酶解牛肉汤，首先将仔细选择的牛肉和牛肝组织按5: 2的重量比混合并绞碎成肉糜。向其中加入1-1.5倍体积的水搅拌均匀，并于大约100℃下加热约60分钟。然后使温度下降至38-41℃，向其中加入约1% (V/V)按下述方法制备的粗胰蛋白酶制剂。在pH 7-9条件下消化处理约1小时。酶水解后，以2000 rpm离心收集上清液，得到蛋白酶水解的牛肉汤。如此制得的肉汤大大增加了细菌生长所需的营养成分，减少了原料的浪费，而且明显地改善了培养基及发酵后所得细菌培养物的味道和口感。

为了制备用于水解牛肉和牛肝组织的粗胰酶提取物，可首先制备动物如牛、马、羊或猪的胰组织匀浆，并按1: 1: 3的比例将所得匀浆与无水乙醇和蒸馏水混合，然后持续搅拌72小时。搅拌后离心(500 rpm, 10分钟)收集上清并用浓盐酸将所得上清液的pH调至5.5，即得到所需的粗制胰蛋白酶制剂。

作为具体实例，本发明特别选择分布于正常人肠道的不同区段，并且彼此在生理学功能上具有一定互补性的包括嗜酸性乳杆菌、短双歧杆菌和屎链球菌的正常肠道益生菌，以制备本发明的含有益生菌共生发酵培养物的营养组合物或营养补充剂。因此，在不背离本发明的基本思想和原则的前提下，选用两种或两种以上其他任何属或种的益生菌，制备具有某种保健功能的营养组合物或营养补充剂，均将落入本发明待批权利要求的范围之内。

一般说来，现有技术中制备包括一种或二种以上益生菌制剂的方法大都是将各个种或株的细菌分别发酵，当细菌增殖至所期望的浓度后，收集活的和/或死的生物量，混合细菌悬液或经冻干处理后得到的冻干菌粉，并加入一种或多种营养素或基质成分，制成具有一定治疗或预防作用的药物或营养组合物或补充剂。然而，从工业化大规模生产角度上看，这些方法的一个共同缺点是生产过程繁杂，

所花费的成本较高，而且混合各菌种或菌株时难以找到最适细菌浓度比例。

本发明人在以前使用传统的分别发酵培养屎肠球菌、双歧杆菌和嗜酸性乳杆菌，以生产含有这三种益生菌的口服营养液的实践中发现，在使用完全相同的培养基及相似的培养条件的情况下，用于制备所说营养液的屎肠球菌(○)在发酵开始阶段的增殖速度较快，即第3小时细菌开始迅速增殖，但到第6.5小时细菌数只达到峰值的大约1/2。第13小时后，细菌增殖速度又开始缓慢增加，到第23-25小时相对稳定在 $2.7 \times 10^8/\text{ml}$ 的水平(参见附图1)。从图1中可以看出，分别单独发酵的嗜酸性乳杆菌(□)和短双歧杆菌(▲)表现有与屎肠球菌不同的增殖曲线。嗜酸性乳杆菌增殖速度较慢，而且在很快达到较高峰值后即进入一个平台，然后是相对平缓的上升阶段。短双歧杆菌的增殖速度亦较为平缓，在大约第15小时达到峰值，但第16-17小时后很快下降并趋于与屎链球菌相似的稳定增殖水平(约 $3.0 \times 10^8/\text{ml}$ )。如图1所示，三种菌在各自单独发酵时，虽然在不同时间达到峰值水平，但进入稳定状态后，它们各自的细胞增殖数均不超过 $3.0 \times 10^8$ 细胞/ml。因此，三种细菌分别发酵的方法不仅工艺操作上很麻烦，而且在利用本发明的培养基发酵生产时，细菌增殖数目也是有限的。

针对现有技术的缺陷，本发明人试图在不改变培养基的情况下，适当调整和控制发酵过程中培养物的pH值和培养温度，摸索并建立了三种细胞在同一培养基中分级接种、共生发酵的方法。现就该方法操作步骤详细描述如下：

首先提供经过灭菌处理的，基本上由重量比25%大豆芽蒸煮液、2.5%蛋白酶水解牛肉肉汤，1.3%酵母浸膏、1.3%葡萄糖，1.3蔗糖、0.03% NaCl、0.05%  $\text{MgSO}_4$ 、0.05%  $\text{CaCO}_3$ 、0.03%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 组成的液体培养基。

在大约pH 7.0和温度约40℃条件下，首先按照湿菌体生物量约

占培养基总重量0.5-1.0%的比例向培养基中接种短双歧杆菌，并于约38-40℃的温度下发酵6-8小时。发酵约6-8小时后，培养物中短双歧杆菌浓度约达到 $3.5 \times 10^8/\text{ml}$ 。然后向培养基中接种约占培养基总重量0.5-1.0%的嗜酸性乳杆菌湿生物量，搅拌均匀后继续发酵培养4-8小时。当发酵培养物中嗜酸性乳杆菌浓度约达到 $3.0 \times 10^8/\text{ml}$ ，或屎肠球菌与嗜酸性乳球菌的总细菌数约达到 $6.5 \times 10^8/\text{ml}$ ，并且发酵培养物的pH降至5.0-5.5时，用0.5N NaOH溶液将pH调至约5.8-6.3，然后再次按照0.5-1.0%的比例向上述培养物中接入屎肠球菌，并在同样温度下继续培养4-8小时。

当发酵过程进行约24小时，并且总细菌浓度约达到 $6 \times 10^8/\text{ml}$ 以上时，通过控制循环水的温度使发酵系统的温度降低至大约30-34℃，并在该温度下保持2-4小时，以完成反应体系中活微生物对培养基固有成分的代谢转化。当培养物的pH降低至大约3.8-4.2时，将体系的温度升高至49℃左右，杀死所有活的细菌细胞，以得到含有热杀死的嗜酸性乳杆菌、双歧杆菌和屎肠球菌及它们的代谢产物，并含有由发酵培养基提供的可溶性食物纤维、大豆异黄酮和大豆寡糖的总发酵培养物。

特别令人惊喜的是，使用本发明的分级接种混合共生发酵方法不仅大大减化了操作步骤，而且显著地提高了三种益生菌的增殖速率。如前所述，在使用同样培养基分别发酵培养三种菌时，尽管它们各自表现有不同的增殖曲线，但培养到大约24-25小时时，每种细菌的细菌浓度均不超过 $3.0 \times 10^8/\text{ml}$ （参见附图1）。然而，按照本发明的分级接种共生发酵方法同时培养三种细菌，这些细菌不仅彼此间没有发生相互干扰和共生抑制现象，而且似乎还可能存在着某种相互协同和生长促进作用。从图2所示的曲线可以看出，在同一培养基中依次分级接种三种益生菌，并在同样发酵条件下使三种细菌共生发酵，发酵培养至大约第24-25小时培养基中的细菌总浓度高达 $11 \times 10^8/\text{ml}$ ，此浓度显然大大超过了三种细菌分别发酵时的细菌总浓度

的简单相加值。虽然不拘泥于理论，但我们推测出现这种体外共生增殖现象的原因可能是由于三种益生菌存在有代谢互补性，即其中一种细菌（如双歧杆菌）的代谢产物（如乙酸和乳酸）将更有利于后来接种的另一种细菌（如嗜酸性乳杆菌）生长。另外，发酵过程中适当调整pH也是促成对酸具有不同耐受性的三种细菌在同一环境中共生的重要因素之一。有理由相信，本发明的多种益生菌分级接种共生发酵方法也适用于在模拟的肠道内生存条件下共生培养更多种（例如五种、七种或七种以上）益生菌，以制备含有多种活的或死的益生菌及其他营养成分的药物或营养组合物。

可以直接将按本发明方法制备含有热杀死的嗜酸性乳杆菌、短双歧杆菌和屎肠球菌的发酵培养物作为营养补充剂，用于恢复和维持胃肠道正常菌群平衡和/或改善机体特异性或非特异性免疫功能（包括抗肿瘤免疫功能）。

或者，可在发酵完成之后（约24小时）和升高发酵体系的温度以热杀死细菌之前，向总细菌培养物内加入适于被所说的细菌或其代谢产物加工或转化的、已知结构或未知结构的任何天然来源的一种或多种药物或其混合物。在接近生理状态的发酵条件（37℃，pH6.0）下，这些天然药物提取物中的一种或多种成分将会在厌氧益生菌或其代谢产物的作用下发生结构改变或代谢转化，使原来无活性的天然药物化合物转化成有活性的化合物，或者将某些原来活性较弱的分子修饰成具有较强生物学活性的分子或其集合体，或者使某些原来具有较强生理毒性的化合物（特别是动物来源的天然化合物）变成有较小毒性或无毒性的化合物或其集合体。

再者，如本领域技术人员已知的，也可在按本发明的分级接种共生发酵方法完成发酵步骤之后，离心分离活的细菌，并按常规方法进行冷冻干燥处理，以制备活的益生菌干燥粉末。可将这样的粉末与适当的载体或赋形剂混合，制成片剂、乳剂、悬浮剂、胶囊剂、栓剂、糖浆等不同剂型的活菌制剂。例如，在制备片剂制剂的情况

下，可使用高岭土、滑石粉等天然矿物粉末或硅酸盐等合成的矿物粉末及蔗糖、乳糖、葡萄糖等糖作为固体载体，并可根据剂型的不同加入烷基磺酸盐或芳基磺酸盐等乳化剂，木质素、羧甲基纤维素、淀粉及聚乙烯吡咯烷酮等分散剂，以及硬脂酸镁、滑石粉、硬脂酸、十二烷基磺酸钠等润滑剂。益生菌活菌制剂的优选剂型是片剂或粉末剂或栓剂等固态制剂，特别是片剂。在制剂固态制剂的情况下，优选的赋形剂是麦芽糖糊精、微晶纤维素、玉米淀粉、果糖、乳糖及右旋糖。除了常用的赋形剂外，还可加入柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸二氢钙等添加剂。在制备片剂药物组合物的情况下，其中还可含有抗胆碱能药、抗组织胺药、止痛药、肾上腺素能药、抗炎剂、保肝剂、抗脂剂及抗肿瘤剂。

为了提高嗜酸性乳杆菌及其他益生菌的存活率，可在片剂中加入L-胱氨酸、维生素（如维生素A、C、D和E）、矿物质（如碳酸钙、氧化镁和碳酸镁）、乳糖、乳清蛋白浓缩物、自溶酵母提取物、脱乙酰甲壳素、卵磷脂及可溶性或非可溶性食物纤维（如苹果纤维或谷物纤维）。其中加入L-胱氨酸主要是为了降低固体片剂中的氧，以延长细菌细胞的存活时间。加入维生素主要是利用它们的抗氧化剂性质。已知在矿物质存在下，食物纤维对嗜酸性乳杆菌的生长具有极好的保护和刺激作用。自溶的酵母提取物不仅用于刺激细菌在胃肠道内的生长，而且也是维生素B的主要来源。有报导认为，维生素D和乳糖对于人胃肠道中钙的吸收具有重要作用。另外，乳糖也有利用肠道中嗜酸性乳杆菌的生长。已有证据表明，脱乙酰甲壳素作为动物来源的食物纤维，其具有促进肠道内钙吸收的作用。卵磷脂则主要作为乳化剂和润滑剂，便于口服片剂的制备。

一般说来，含有冻干的活乳酸菌、双歧杆菌和屎肠球菌的口服片剂每片重约500-1500mg，较好为750mg，并且每片中细菌重量约占组合物总重量的30-80%。

下列实施例旨在进一步举例说明按本发明方法制备的益生菌制剂的优点及应用，这些实施例并不以任何方式限制本发明待批权利要求的范围。

## 实施例

### 实施例1: 益生菌共生发酵培养物的制备

本实施例旨在举例说明以分级接种、共生发酵方法，在同一培养基中生产混合的嗜酸性乳杆菌、短双歧杆菌和屎肠球菌的共生发酵培养物的方法。

#### 1. 益生菌菌种的选择

双歧杆菌是人或哺乳动物体内最重要的生理性细菌，主要分布于小肠下部和结肠中。已知双歧杆菌对于人体的营养、生长、发育及免疫功能均具有重要作用。嗜酸性乳杆菌是人体内分布最为广泛的益生菌。在胃肠道中，该细菌主要分布于迴肠部。嗜酸性乳杆菌参予维生素，特别是B族维生素的生物合成，具有辅助食物消化、促进营养素代谢及提高宿主对乳糖的耐受性等功能。屎肠球菌主要分布在小肠的盲肠部分，具有帮助胆固醇分解代谢，降低血胆固醇的作用。因此，本发明选用短双歧杆菌、嗜酸性乳杆菌和屎肠球菌等三个常见益生菌菌株，主要是基于它们在人肠道内分布的总体广泛性及其生理学活性的互补性。

可以从中国典型培养物保藏中心（CCTCC）（中国，武汉）等菌种保藏机构购得，或者从正常人的粪便或肠粘膜组织中分离得到这些细菌菌株。

#### 2. 培养基组成及制备

培养基组成：每升培养基含有25ml蛋白酶水解牛肉肉汤、15g酵母浸膏、250ml大豆芽蒸煮液、12g葡萄糖、13g蔗糖、5g  $\text{MgSO}_4$ 、3g  $\text{CaCO}_3$ 、3g  $\text{NaCl}$ 、3g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。

基本上按照本说明详细描述部分所述的方法制备用于配制本发



明特定培养基的蛋白酶水解牛肉肉汤和大豆芽（或发芽大豆）蒸煮液。将培养基各成分混合均匀后，于121℃高压灭菌30分钟备用。

### 3. 分级接种共生发酵方法

将经过灭菌处理的上述培养基100升加热至大约40℃，按生物量湿重约占培养基总重量约0.8%的比例（W/W）在培养基中接种活化的双歧杆菌1000g（湿重），并于39℃下厌氧发酵7.5小时。当发酵过程中pH降至5.0时，持续搅拌下向培养基中滴加适当量的0.5N NaOH以将pH调到大约6.2，并再次向培养基中接种活化的屎肠球菌生物量约950g（湿重），并搅拌20分钟。于同样温度下继续发酵培养6小时。当发酵罐内pH降至大约5.5时，再次向培养基中加入0.5N NaOH溶液以将调至6.2，然后接种嗜酸性乳杆菌生物量约850g（湿重），并继续在同样温度下发酵。当发酵罐内总细菌浓度达到 $6.5 \times 10^8/\text{ml}$ 以上，并且pH降低到大约3.5-3.8时，通过控制循环水温度使发酵培养物的温度降低至大约32℃，并保持约2小时，以完成发酵产物的生物转化。发酵完成后，根据如此得到的益生菌共生发酵培养物的使用目的的不同，可以（1）离心收集共生发酵的活的益生菌并冻干之，以制备含有冻干菌粉的固体药物或营养补充组合物；（2）向包括培养基和活菌及其代谢产物的培养物中加入待转化的天然药物提取物，以制备具有特定生物学活性和功能的药物组合物；（3）使发酵培养物的温度升高至大约39℃，热杀死增殖的活菌，离心分离培养物上清后或直接制备含有益生菌共生发酵产物及细菌碎片的营养补充组合物。

对共生发酵培养物上清的生物化学分析结果显示，培养物上清中水解氨基酸含量达23.322 mg/ml，其中可以满足双歧杆菌和乳杆菌生长所需，并且含有二硫键的胱氨酸含量为1.8 mg/ml（水解的）和0.33 mg/ml（游离的）。共生发酵培养物上清中总糖含量约为0.04 mg/ml，其中除还原糖外，还存在有双歧杆菌等益生菌生长繁殖所需的低聚糖和膳食纤维。后者在肠道内具有抑制血糖升高，阻止中性

脂肪和胆固醇吸收及缓解便秘的作用。另外，用乙酸乙酯提取并用HPLC法分析（255nm），测得培养物上清中大豆异黄酮的细菌转化产物即大豆甙元高达80  $\mu\text{g/ml}$ 。再者，培养物上清中还含有多种维生素和一定量的矿物质，其中主要是B族维生素（约40 mg/l）及P、Fe、Zn、Mg、K和Na等矿物质（分别为5.04、5.36、8.29、88.83、783、283mg/l）。这些检测结果进一步表明共生发酵培养物上清足可作为培养基，提供细菌生长所需的全部营养素。在细菌增殖到一定程度之后，由于菌体代谢产生大量酸性产物（有机酸），故导致培养体系的pH值下降（pH 4.0以下），进而使细菌停止生长。

#### 实施例2：益生菌培养物对肠道致病菌的体外抑菌和杀菌活性

本实施例旨在举例说明按本发明方法制备的双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和屎肠球菌的共生发酵培养物对某些已知肠道致病菌的体外抑菌和杀菌作用。

1、以弗氏痢疾杆菌、携带耐药质粒的D15痢疾杆菌，多耐药性大肠杆菌及鼠伤寒沙门氏菌作为靶细菌，以小井法检测本发明的益生菌共生发酵培养物（IV号样品）和按相似方法制备的单一益生菌发酵培养物（I、II、和III号样品）对这些病原菌的体外抑菌活性。首先用打孔器在营养琼脂板上打孔（直径6mm），并在各实验孔内加入用生理盐水105倍稀释的上述病原菌的18小时肉汤培养液。将平板37℃保温2小时后，向各实验孔内分别加入0.1ml单独发酵或混合共生发酵的益生菌培养物上清液。37℃下厌氧保温24小时，然后取出琼脂板观察并记录加样孔周围的抑菌环直径（mm）。结果如下列表1所示。

表1 共生发酵培养物与单一菌株发酵培养物对肠道致病菌的体外抑菌活性

致病菌	试验		样品	
	# I	# II	# III	# IV
弗氏痢疾杆菌	8.0*	-	-	13.0
D15痢疾杆菌	-	-	-	11.5
多耐药大肠杆菌	-	-	-	8.5
伤寒杆菌	-	-	-	10.5

\*表中数字为培养物上清的抑菌环直径毫米 (mm) 数。

从表1中所给出的数据可以看出, 在模拟肠道环境的实验条件(病原菌稀释液内含有0.1%胆盐)下, 按本发明方法制备的多株益生菌共生发酵培养液上清对四种常见的肠道致病菌的抑菌环直径达8.5-13.0mm。然而, 在同样条件下, 三种细菌各自的单独培养物上清则几乎未出现这样的抑菌环。实验结果表明, 按本发明方法制备的益生菌共生发酵培养物具有十分显著的体外抑菌活性。

2、以常见的肠道致病菌弗氏痢疾杆菌、多耐药大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌作为靶细菌, 以倾注平板法检测本发明的益生菌共生发酵培养物对这些病原微生物的体外杀菌活性。

首先, 在含有4ml按本发明方法制得的益生菌共生发酵培养物上清的试管内加入约4 $\mu$ l致病菌悬液10<sup>5</sup>细菌/ml, 并于37℃保温约18小时。预培养后, 于试验的0、2、6小时分别取1ml试验样品加于10ml溶融的营养琼脂中, 混合后倾注于玻璃平板上。将平板置于37℃孵箱中保温24小时后观察并记录所形成的细菌菌落数。使用生理盐水(NS)作为对照。

表2 益生菌共生发酵培养物对肠道致病菌的体外杀菌活性

接触时间	伤寒杆菌		痢疾杆菌		大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
	+培养物	+NS	+培养物	+NS	+培养物	+S	+培养物	+盐水
0	288*	890	1080	1200	1248	1800	1302	1460
2	0	1120	0	1140	62	1950	1050	1540
6	0	1320	0	1260	0	1920	620	1488

\*数值为相应致病菌加益生菌共生发酵培养物（实验组）或生理盐水（对照组）保温不同时间（0.2, 6小时）后，在营养琼脂平板上形成的致病菌菌落数。

从表2所示的结果可以看出，胃肠道致病菌与按本发明方法制备的益生菌共生发酵培养物接触约2小时后，分散于营养琼脂培养基中的所有沙门氏鼠伤寒杆菌、弗氏痢疾杆菌、耐药大肠杆菌几乎全部被杀死。接触约6小时后，对绝大部分对所说的共发酵培养物敏感性较低的金黄色葡萄球菌也被杀死。实验结果表明，按本发明方法制备的益生菌共生发酵培养物表现有十分显著的体外杀菌活性。

实施例3: 益生菌共发酵培养物上清对肠道益生菌的体外生长促进作用

本实施例旨在举例说明按本发明方法制备的益生菌共发酵培养物对长双歧杆菌（*B. longum*）、两歧双歧杆菌（*B. bifidum*）和嗜酸性乳杆菌（*L. acidophilus*）的体外生长促进作用。

使用长双歧杆菌、两歧双歧杆菌和嗜酸性乳杆菌作为实验菌，实验菌经活化后按每管0.1ml（接种后培养基细菌浓度为 $10^6$ 个/ml）分

别接种于(1)常规PTYG培养基(每升培养基含有胰蛋白胨5g、大豆蛋白胨5g、酵母提取物10g、葡萄糖10g、盐溶液40ml、半胱氨酸盐酸盐0.5g吐温80 0.1ml、0.1%刃天青1ml);(2)缺少酵母提取物或(3)缺少胰蛋白胨和大豆蛋白胨,或(4)缺少蛋白胨和酵母提取物,但均以本发明的益生菌共生发酵培养物上清代替这些成分的PTYG培养基以及单纯的共生发酵培养物上清(作为培养基)中。接种后将试管置于37℃下恒温培养24小时。培养后收集培养液,取1/100稀释液0.1ml制作Hungate厌氧滚管,并于37℃下继续培养48小时,然后进行菌落计数。结果如下列表3所示。

表3 益生菌共生发酵培养物上清对双歧杆菌及嗜酸性乳杆菌生长的影响

培养基	双歧杆菌	长双歧杆菌	嗜酸性乳杆菌
益生菌共生培养物	$1.53 \times 10^8$	$1.03 \times 10^{10}$	$1.04 \times 10^8$
全成分PTYG培养基	$1.39 \times 10^8$	$1.22 \times 10^{10}$	$8 \times 10^8$
缺少酵母提取物的			
PTYG共生培养物	$2.0 \times 10^8$	$1.24 \times 10^{10}$	$1.2 \times 10^9$
缺少蛋白胨的PTYG+			
共生培养物	$1.37 \times 10^8$	$6.4 \times 10^9$	$4.5 \times 10^8$
缺少蛋白胨和酵母提取			
物的PTYD+共生培养物	$1.67 \times 10^8$	$9.7 \times 10^9$	$3.0 \times 10^8$

从表3中所示的数据可以看出,将双歧杆菌和嗜酸性乳杆菌等已知的益生菌接种于不含任何常规培养基成分的本发明益生菌共生培养物上清中培养48小时后,被接种的细菌数均增殖到 $10^8$ cfu/ml以上。另一方面,用本发明的益生菌共生发酵培养物上清代替常规PTYD培

培养基中的碳源、氮源及矿物质来源材料，培养后三种被试细菌的细胞数亦在 $10^8$ cfu/ml以上。因此可以认为，按本发明方法制备的多种（株）益生菌共生发酵培养物上清对正常人肠道中的主要益生菌具有明显的生长促进作用。虽然有关机理尚不明确，但推测这种益生菌生长促进活性与所说的培养物中含有作为碳源的低聚糖（包括果寡糖、半乳寡糖和大豆寡糖）（即所谓“双歧因子”）、水解氨基酸（包括胱氨酸等含二硫键的氨基酸）、矿物质（钙、镁、磷、钾等）、B族维生素（B1、B2、B6）及其他氮源物质有关。

#### 实施例4：益生菌共生发酵培养物对小鼠非特异性免疫功能的影响

本实施例旨在借助小鼠腹腔巨噬细胞吞噬试验（体内法）和小鼠迟发型足垫反应试验观察并评价本发明的益生菌共生发酵培养物对哺乳动物非特异性免疫功能的影响。

##### 1、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬试验（体内法）

以体重约20-25g的健康Balb/c小鼠作为动物模型，以鸡红细胞作为被吞噬细胞，基本上按照文献中已描述的常规方法进行细胞吞噬试验。简单地说，将动物随机分成实验组和对照组（每组10只），常规圈养3天后，对实验组动物每天每只灌胃投用按本发明方法制备的益生菌共生发酵培养物原液（上清）0.5ml，连续投用15天。对照组动物则饲以同体积的生理盐水。15天后，断颈处理动物并收集腹腔吞噬细胞，以生理盐水洗过的鸡红细胞作为靶细胞，高倍显微镜下计数并记录实验组和对照组动物腹腔巨噬细胞的红细胞吞噬数，并由之计算巨噬细胞的百分吞噬率（%）和吞噬指数。结果如下列表4所示。

表4 益生菌共生发酵培养物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

组别 (n=10)	百分吞噬率 (%)	吞噬指数 ( $\bar{X} \pm SD$ )
实验组	$88.2 \pm 5.51$	$5.27 \pm 0.56$
对照组	$67.7 \pm 8.08$	$24.2 \pm 0.62$

## 2、小鼠迟发型足垫反应

以体重约20-25g的健康昆明种小鼠作为动物模型，按常规方法进行迟发型足垫反应试验。简单地说，对分笼圈养的动物连续喂饲按本发明方法制备的益生菌共生发酵培养物共12天（0.5ml原液/只/天），第13天在小鼠左后足垫内注入0.1ml鸡红血细胞（ $10^3$ 细胞/ml）。96小时后以同样量的鸡红细胞攻击动物右后足垫。攻击前和攻击后24小时分别在体视显微镜下测量小鼠右后足垫的厚度，并由之计算出足垫增厚程度（mm）。试验中使用同样体积的生理盐水作为对照。结果如下列表5所示。

表5 益生菌共生发酵培养物对小鼠迟发型足垫反应的影响

组别 (n=10)	足垫厚度 (mm)
实验组	$1.89 \pm 0.43^*$
对照组	$0.98 \pm 0.40$

\*所给出的数值为10只动物的平均数 $\pm$ 标准差。P<0.01。

巨噬细胞吞噬异物的能力代表哺乳动物非特异性免疫功能之一，而迟发型足垫变态反应则反映哺乳动物的细胞免疫状态。从表3和4所示的数据可以看出，本发明的益生菌共生发酵培养物，表现有良好的非特异性免疫功能增强活性，故在临床上能用作免疫增强剂使用。

## 权 利 要 求

1. 一种含有灭活的或热杀死的一种以上肠道益生菌，并含有可溶性膳食纤维及大豆异黄酮的悬液态营养组合物。
2. 根据权利要求 1 的营养组合物，其中所说的益生菌选自乳杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属、肠球菌属、丙酸菌属、明串珠菌属、芽孢杆菌属的一种或多种人肠道非致病菌。
3. 根据权利要求 1 的营养组合物，其中所说的益生菌选自两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、嗜酸性乳杆菌、保加利亚乳杆菌、奶酪乳杆菌、德氏乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、嗜柠檬酸明串珠菌、枯草芽孢杆菌和地衣形芽孢杆菌。
4. 根据权利要求 1 的营养组合物，其中所说的可溶性纤维含量约为每毫升含 20-40  $\mu$ g，并且其中所说的大豆异黄酮含量为每毫升 30-100  $\mu$ g。
5. 生产权利要求 1-4 中任一项所限定的悬液态营养组合物的方法，该方法包括：
  - (1) 提供基本上由大豆芽蒸煮液、蛋白酶解牛肉肉汤、酵母浸膏、糖和矿物质组成的液体培养基；
  - (2) 按照湿菌体生物量约占培养基总重量 0.5-1.0% 的比例，依次向培养基内接种待培养的二种或二种以上肠道益生菌，并在每接入一种细菌后，于 38-41℃ 的温度和 pH 6.6 条件下，厌氧培养 4-10 小时；
  - (3) 当发酵培养物中菌体总浓度约达到  $7 \times 10^8$ /ml 以上时，使温度降至约 32℃ 并维持 2-4 小时，以完成微生物体的代谢转化；
  - (4) 当发酵培养物的 pH 降至大约 3.5—3.9，使温度升高至 48-50℃ 并保持 4-6 小时，以完成菌体热灭活和发酵体系稳定化。
6. 根据权利要求 5 的方法，其中所说的液体培养基是由约 25% 大



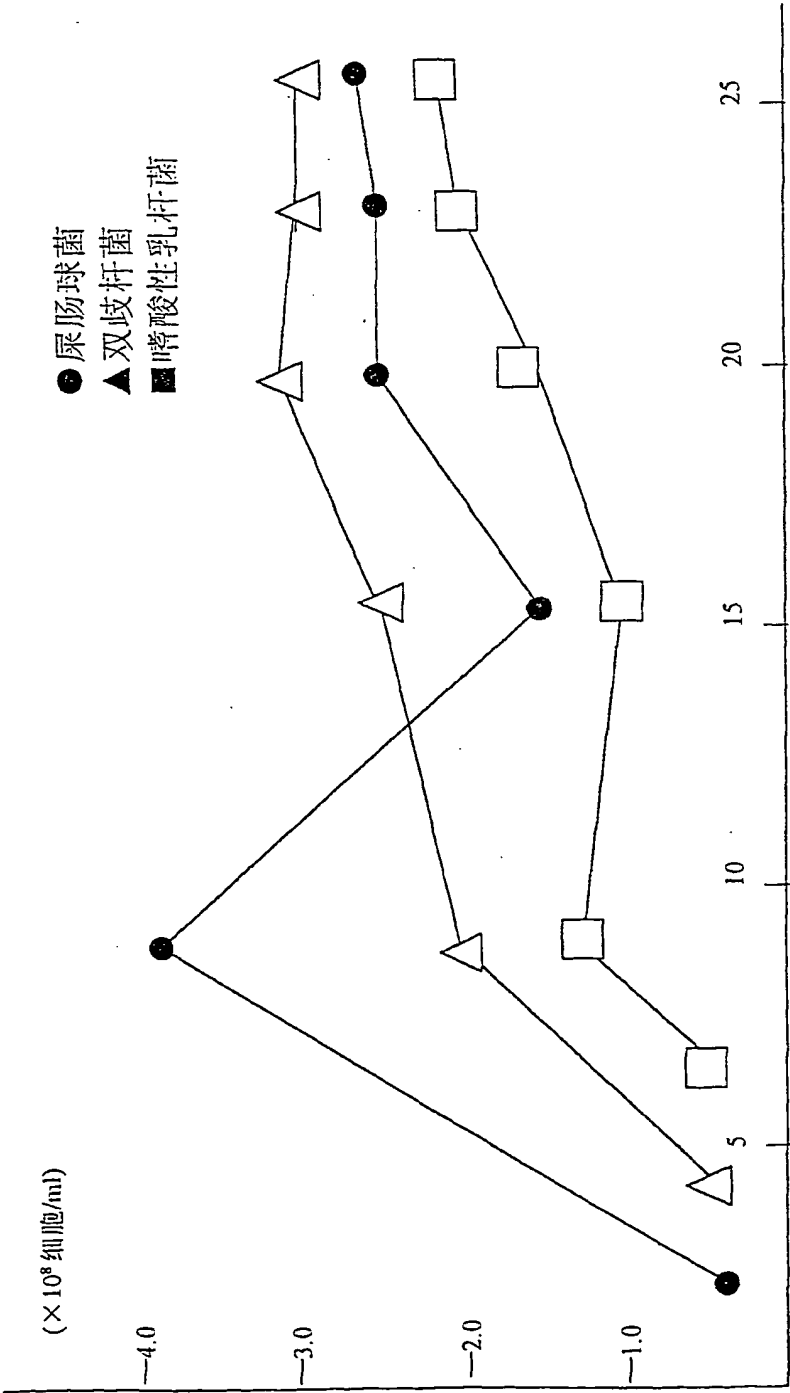
豆芽煎煮液、约 2.5%胰蛋白酶水解牛肉肉汤、约 1.3%酵母浸膏、约 1.3%葡萄糖、约 1.3%蔗糖和适当量包括  $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $K^{+}$ 、 $Na^{+}$  的矿物质组成的。

7. 根据权利要求 5 的方法，其中所说的肠道益生菌选自两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、嗜酸性乳杆菌、保加利亚乳杆菌、奶酪乳杆菌、德氏乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、嗜柠檬酸明串珠菌、枯草孢杆菌和地衣形芽孢杆菌。

8. 权利要求 1-4 中任一项所限定的营养组合物在纠正和维持肠道正常微生物生态平衡中的应用。

9. 权利要求 1-4 中任一项所限定的营养组合物在调整机体非特异性免疫反应中的应用。

10. 权利要求 1-4 中任一项所限定的营养组合物在生物转化或修饰一种或多种天然药物的有效成分并使之发挥或改善其生物学活性中的应用。



(小时) Fig. 1

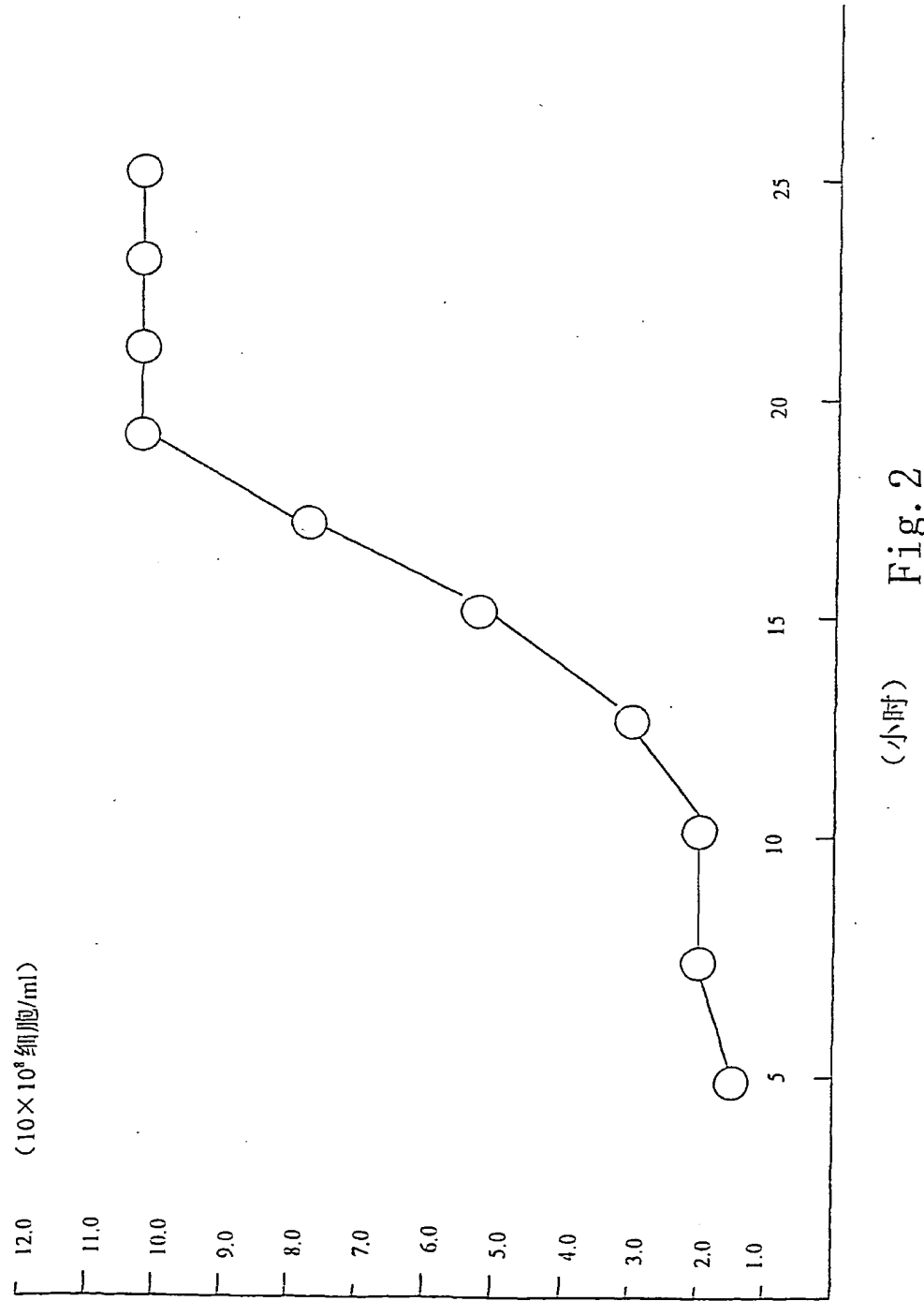


Fig. 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational application No.

PCT/CN01/00617

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup> A61K35/66, A61K35/78, C12P1/04

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup> C12P, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, Genbank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PDB, CNPAT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	CN1192360(DONGFANG BAIXIN BIOLOGICAL TECH CO LTD) 9 September 1998 See the whole document.	1-10
X	CN1223865(XINYI PHARM CO LTD SHANGHAI) 28 July 1999 See the whole document.	1-4, 8-10
X	CN1103584(KELI MEDICAL BIOLOGY INST JINAN HIGH TECH) 14 June 1995 See the whole document.	1-2
A	WO9929833(WADSTROM, Torkel[SE/SE]) 17 June 1999 See the abstract and claims.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 September 2001(25.09.01)

Date of mailing of the international search report

18 OCT 2001 (18.10.01)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office  
6, Xincheng Road, Haidian District,  
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

CHANG,mao

Telephone No. 86-10-62093906



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int	al application No.
PCT/CN01/00617	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
CN1223865	1999-07-28	GB2338244	1999-12-15
CN1192360	1998-09-09	NONE	
CN1103584	1995-06-14	NONE	
WO9929833	1999-06-17	SE9704577	1999-06-09
		AU1896899	1999-06-28
		NO20002919	2000-08-08
		EP1036160	2000-09-20

## A. 主题的分类

IPC<sup>7</sup> A61K35/66, A61K35/78, C12P1/04

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC<sup>7</sup> C12P, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, Genbank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PDB, CNPAT

## C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	CN1192360(北京东方百信生物技术有限公司) 1998 年 9 月 9 日 见全文。	1-10
X	CN1223865(上海信谊药业有限公司) 1999 年 7 月 28 日 见全文。	1-4, 8-10
X	CN1103584(济南高新开发区克立医药生物研究所) 1995 年 6 月 14 日 见全文。	1-2
A	WO9929833(WADSTROM, Torke[瑞典/瑞典]) 1999 年 6 月 17 日 见权利要求和摘要。	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” x 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引

用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&amp;” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

25.9 月 2001(25.09.01)

国际检索报告邮寄日期

18. 10 月 2001 (18.10.01)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

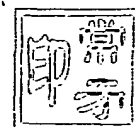
传真号:

86-10-62019451

受权官员

常 矛

电话号码: 86-10-62093906



国际申请号  
PCT/CN01/00617

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(1992 年 7 月)